

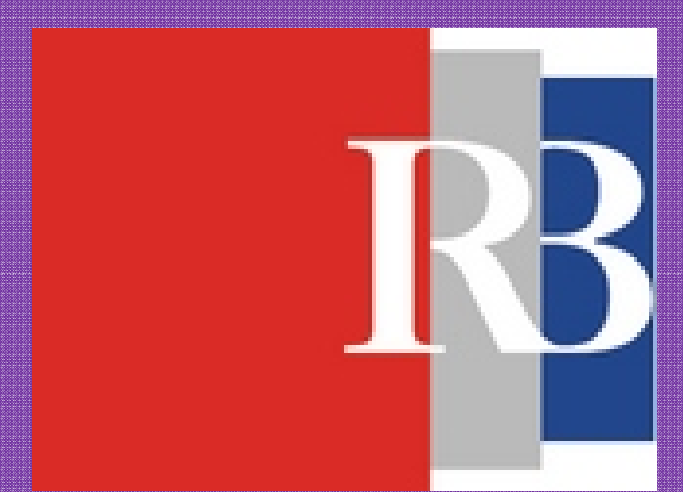
MOLEKULSKA ARHITEKTURA

BIOMAKROMOLEKULE- od *in vitro* do *in silico*

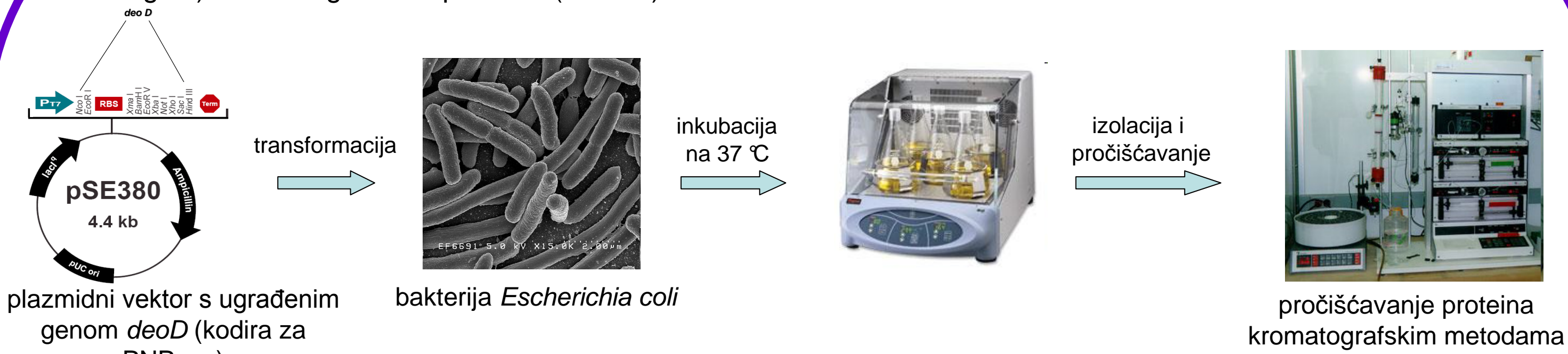
K. Čondić-Jurkić¹, M. Grabar², N. Ivić², G. Mikleušević², I. Sabljic², A. Tomić²

¹Zavod za organsku kemiju i biokemiju, Grupa za kvantnu organsku kemiju

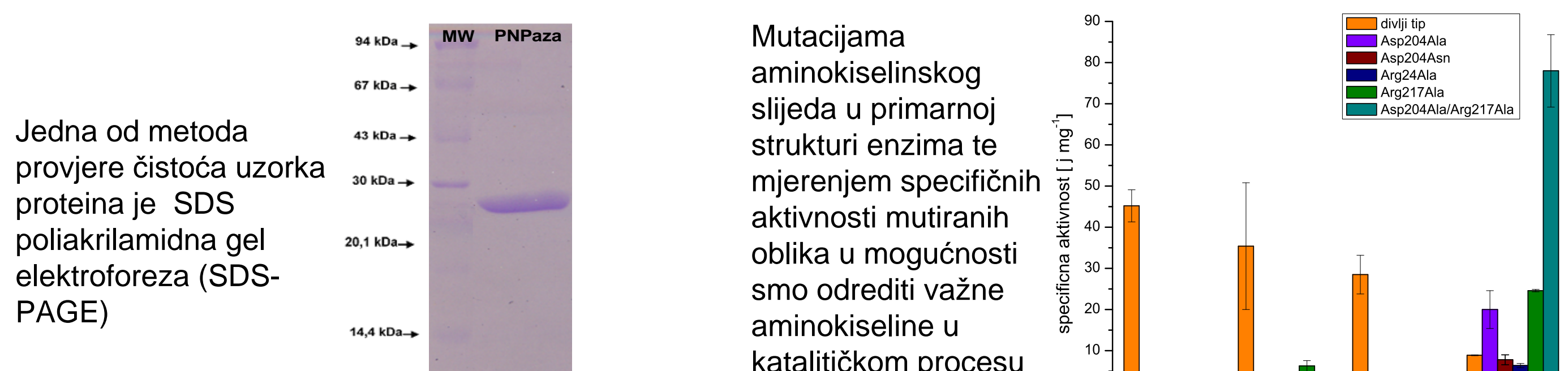
²Zavod za fizičku kemiju, Laboratorij za kemijsku i biološku kristalografiju



U opisivanju protein-ligand interakcija *in vitro* koristimo interdisciplinarni pristup koji uključuje genetičke, biokemijske i kristalografske metode. Radi što boljeg opisa, potrebno je proizvesti dovoljne količine (10-100 mg/ml) vrlo čistog uzorka proteina (> 95 %).

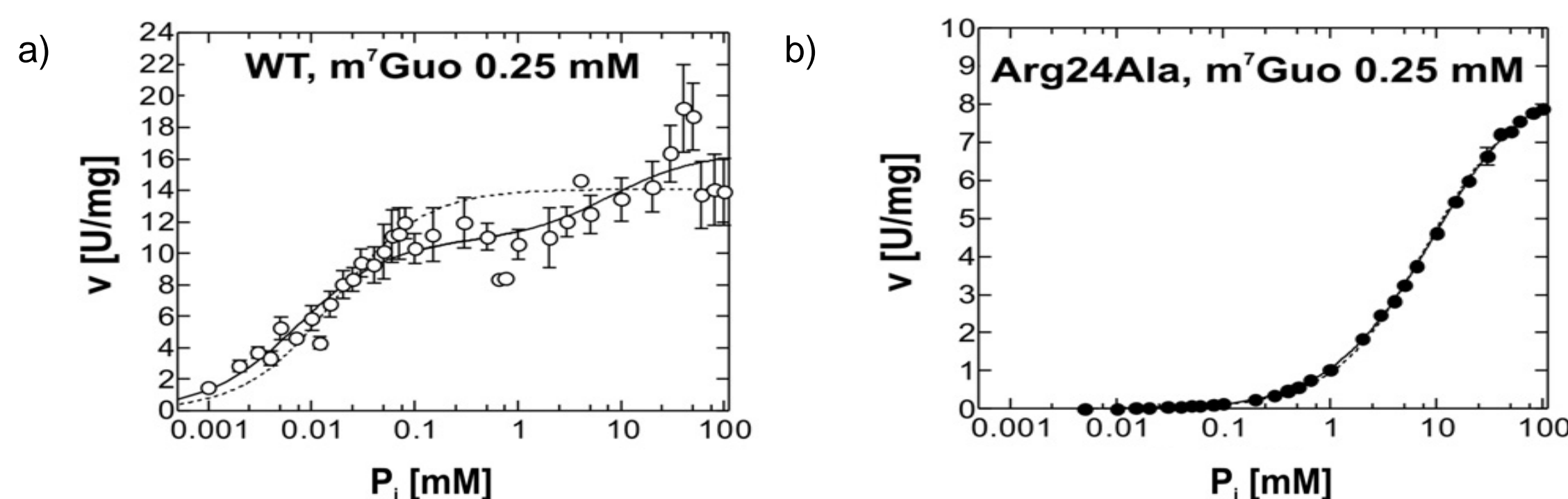


Slika 1. Shematski prikaz ekspresije i pročišćenja purinske nukleozidne fosforilaze (PNPaze) iz bakterije *Escherichia coli*



Slika 2. SDS-PAGE pročišćenog uzorka PNPaze iz *E. coli*

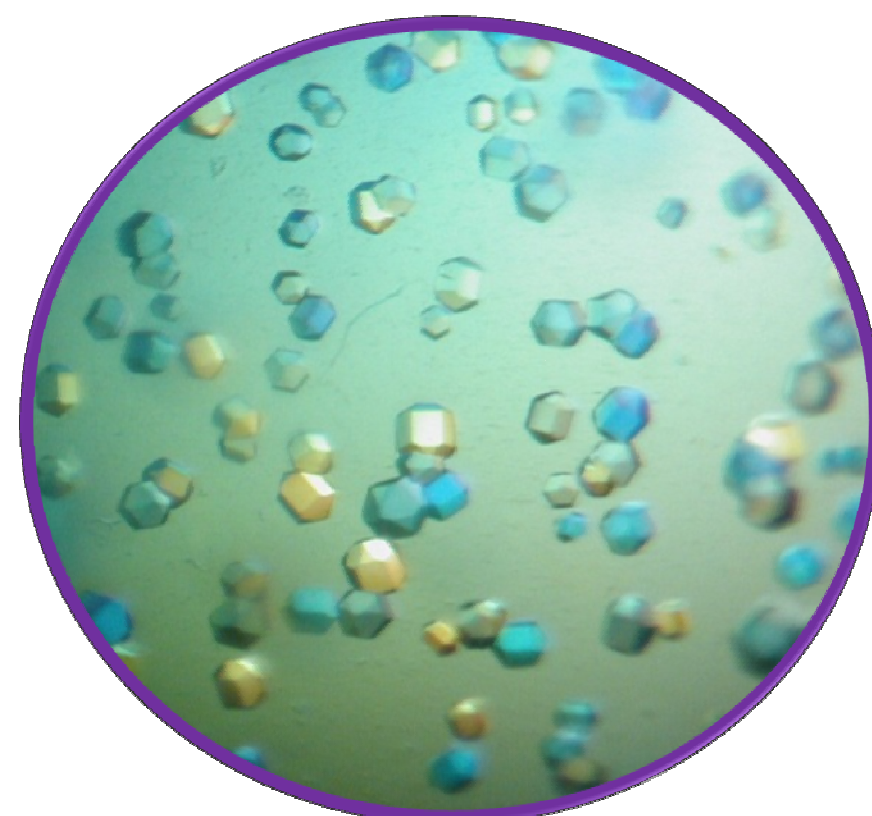
Kinetika enzimске reakcije daje nam uvid u mehanizam djelovanja enzima



Slika 4. Kinetika enzimске reakcije u ovisnosti o ortofosfatu (P_i) za (a) divlji tip (WT) PNPaze i (b) mutirani oblik Arg24Ala. Na dijagramu je prikazana prilagodba prema Michaelis-Mentenovom modelu (---) i modelu alosteričke interakcije koji uključuje dva katalitički nezavisna mjesta (—)^{1,2}.

Biomakromolekulska kristalografija jedna je od metoda određivanja 3D strukture biomolekula.

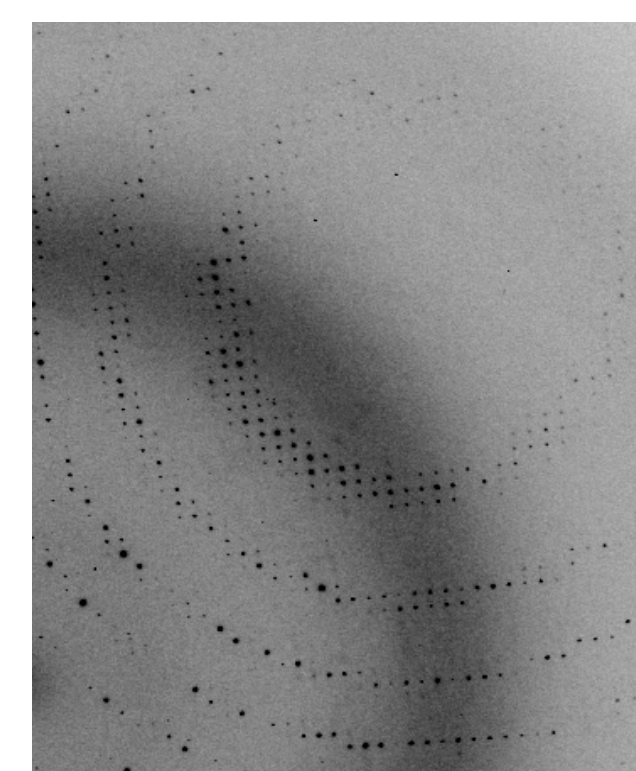
Kristalizacija. Prvi korak je priprema monokristala biološke makromolekule. Ovaj se korak smatra "uskim grlom" biomakromolekulske kristalografije jer je još uvijek nemoguće predvidjeti uvjete kristalizacije.



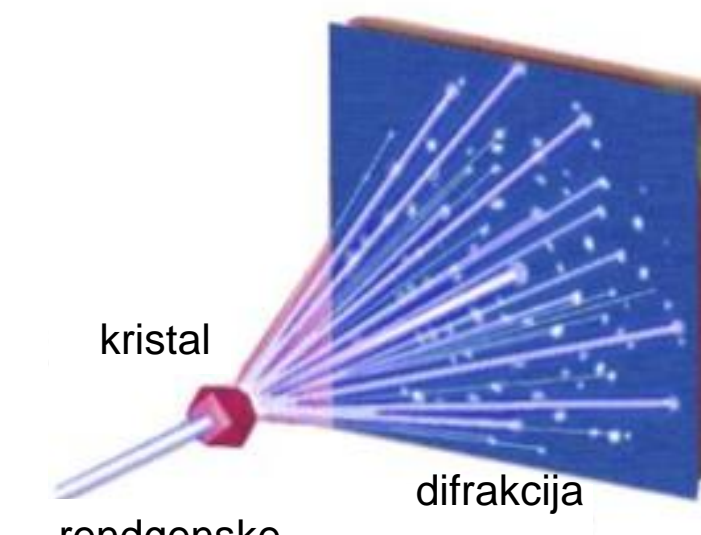
Slika 1. Kristali proteina.



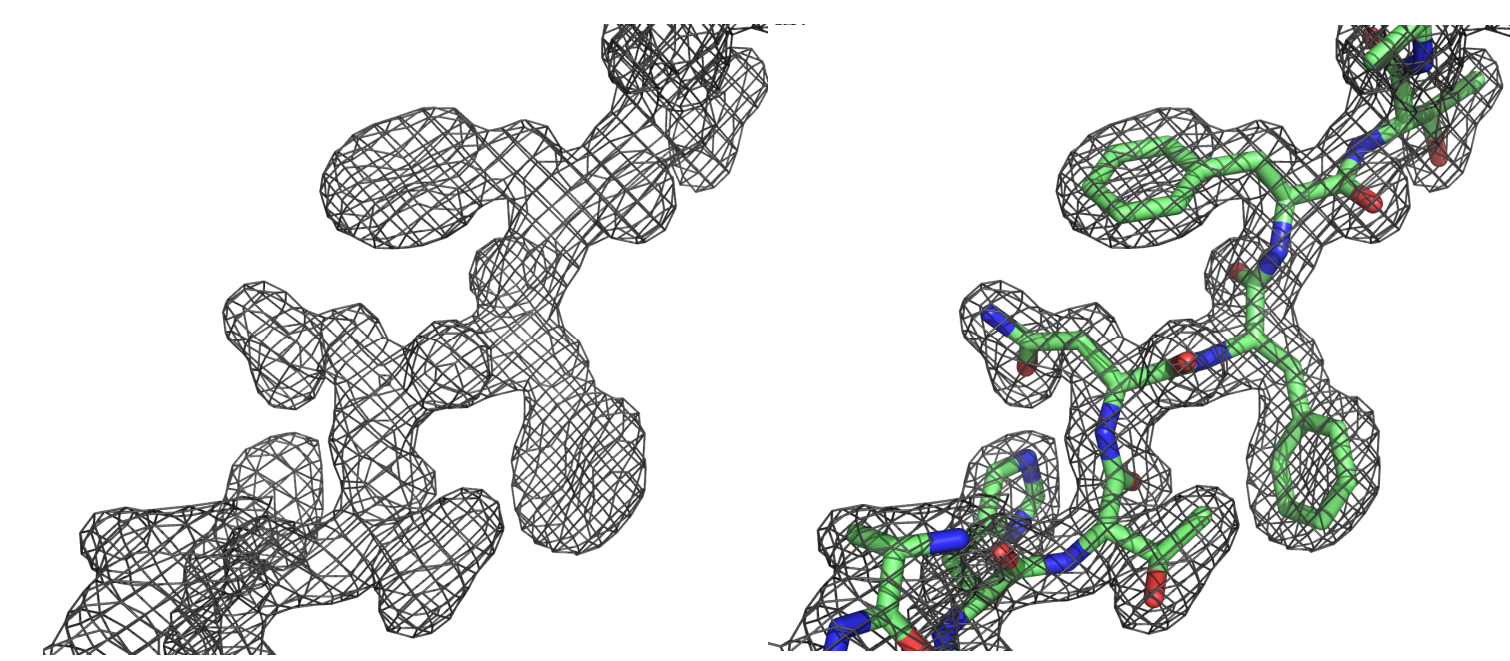
Slika 2. Kristal proteina montiran za snimanje u struji tekućeg dušika.



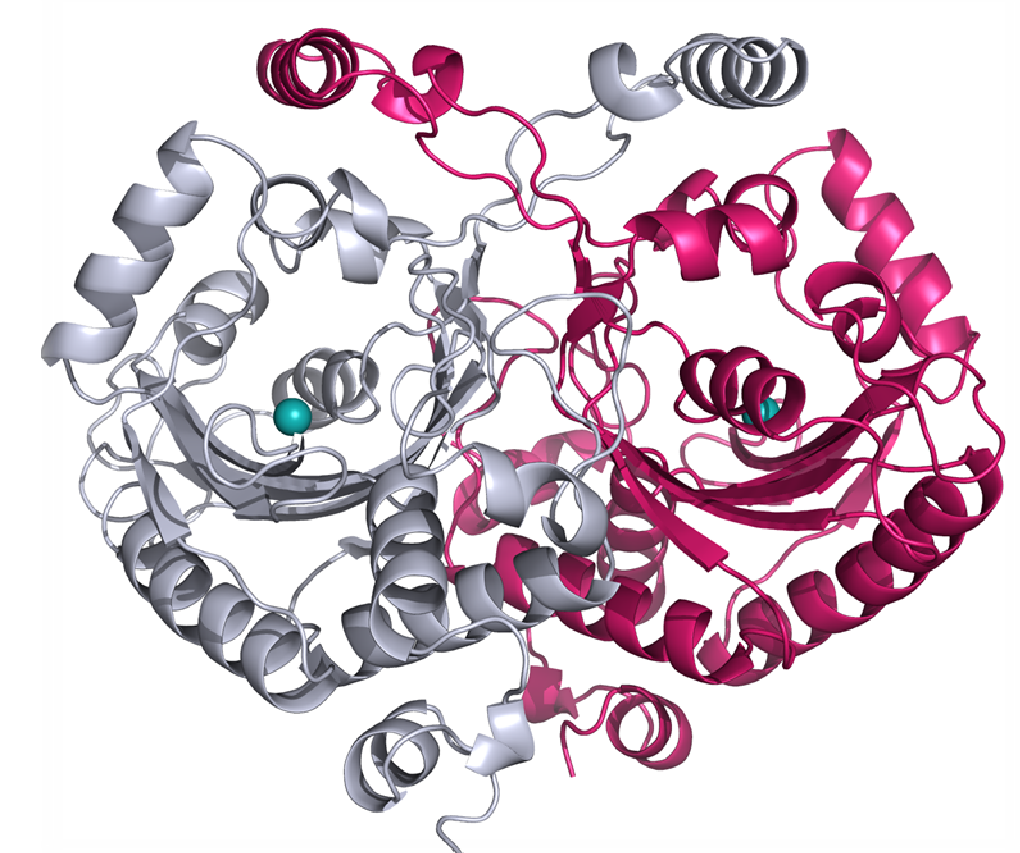
Slika 3. Difrakcijska slika proteinskog kristala.



Difrakcija. Kada dobijemo kristal zadovoljavajuće kvalitete i veličine (npr. 0.3 mm), izložimo ga rendgenskim zrakama određene valne duljine.



Slika 4. Rezultat eksperimenta su mape elektronske gustoće koje služe za izgradnju trodimenzijskog atomskog modela makromolekule.

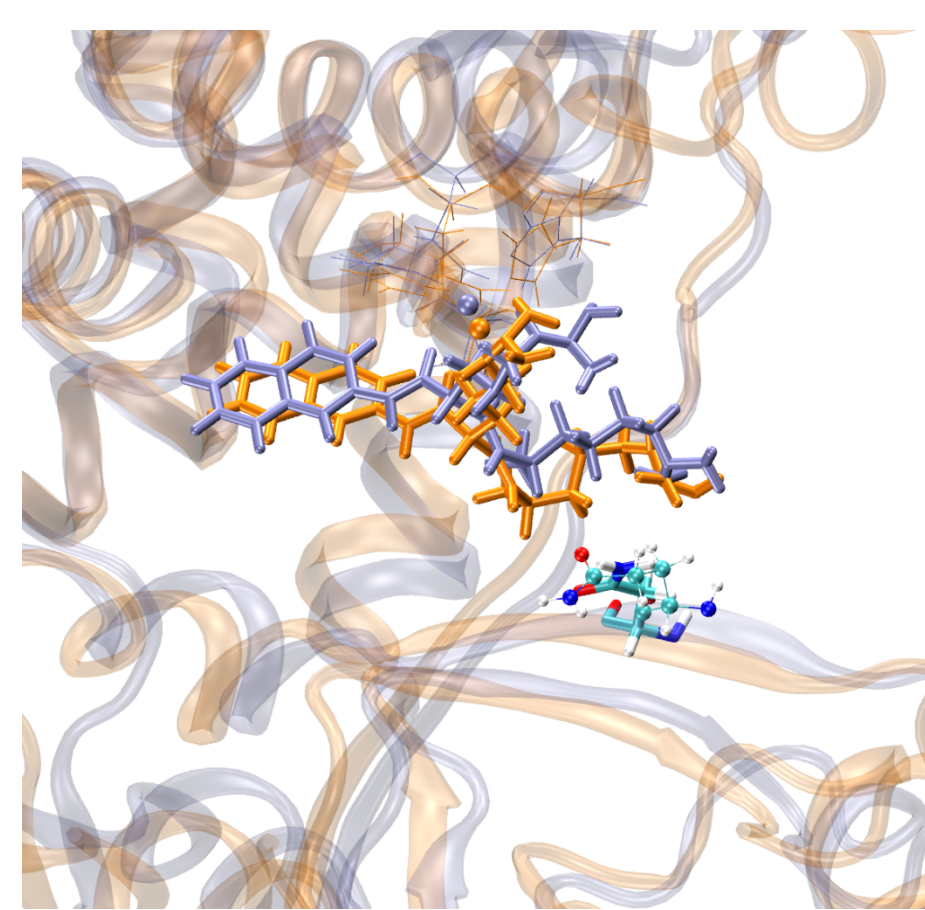


Slika 5. Konačni model strukture glicil:protein nosač ligaze čije su koordinate pohranjene u *Protein Data Bank* bazu podataka (3MF2)³. (<http://www.pdb.org/pdb/home/home.do>).

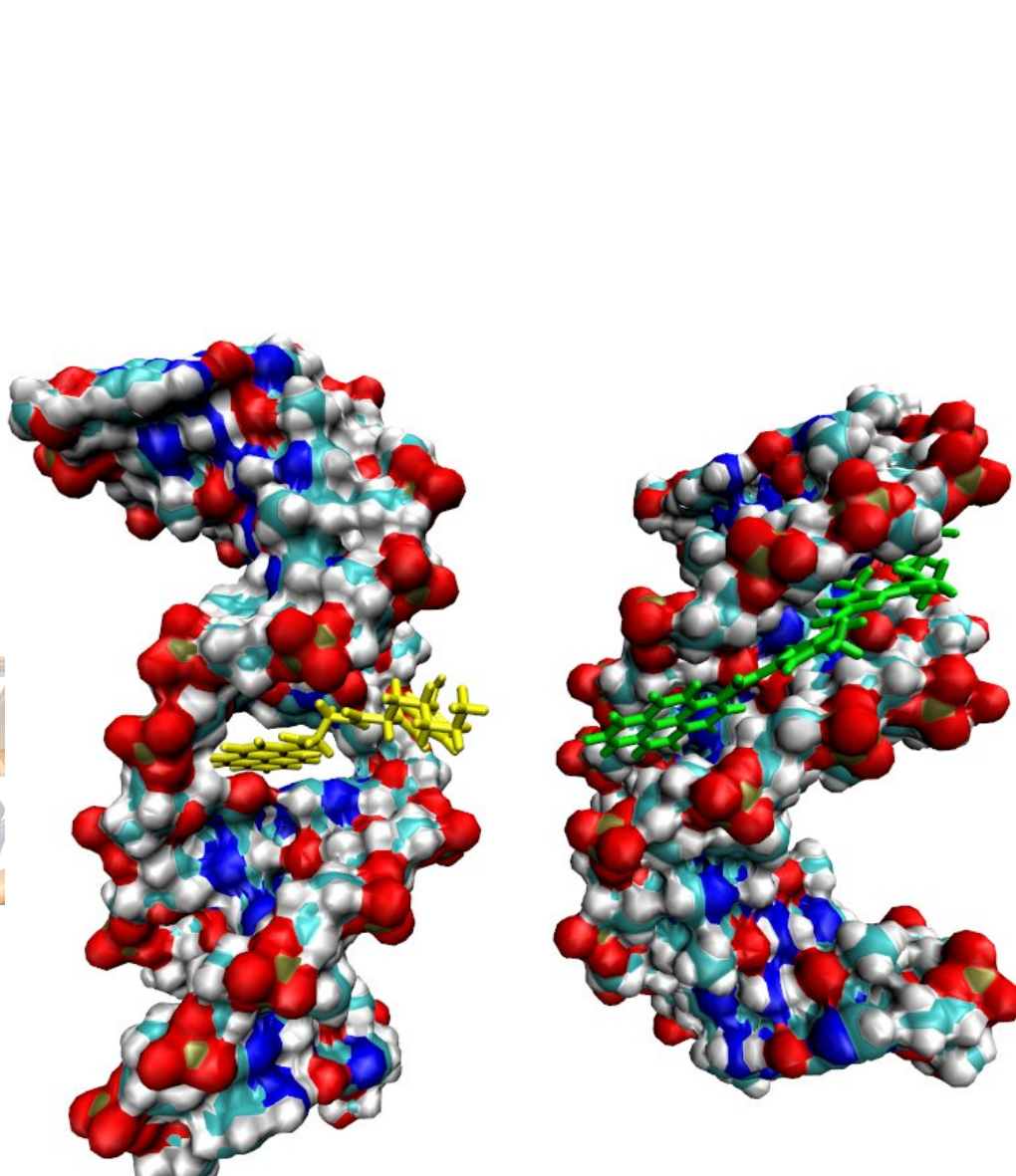
Dobiveni rezultati značajno pridonose razumijevanju specifičnih interakcija proteina i nukleinskih kiselina s raznim prirodnim i sintetskim supstratima i inhibitorima. Takva saznanja mogla bi dovesti do otkrića novih, specifičnijih i potentnijih liganada, te imati značajnu primjenu u medicini.

Iako se rezultati dobiveni računalnim simulacijama potvrđuju kroz njihovo slaganje s eksperimentom, sasvim je uobičajeno da proces suradnje promijeni smjer te da "komputeraši" daju upute eksperimentalcima za slijedeće eksperimente, čime njihova suradnja postaje dvosmjerna:

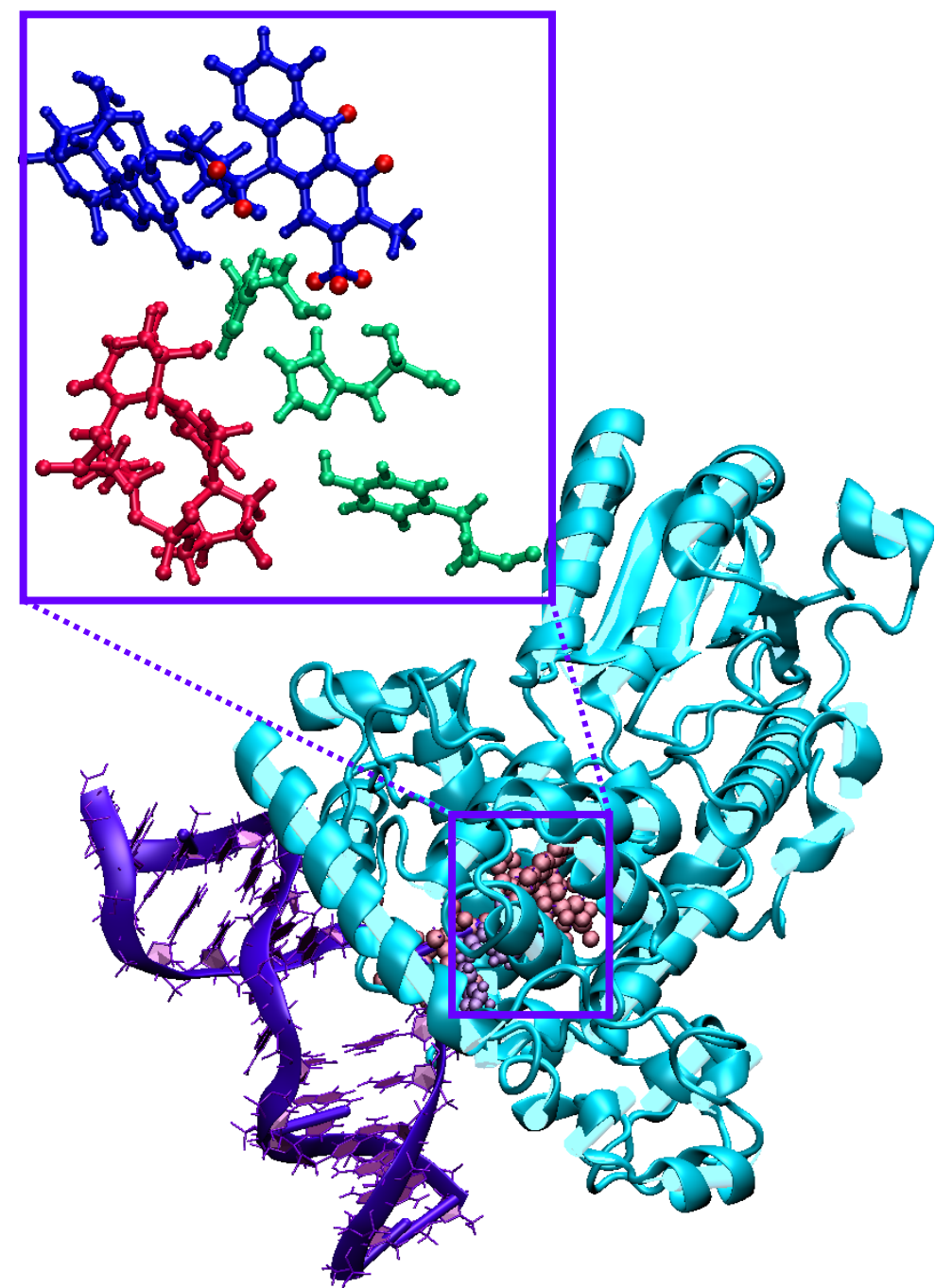
in vitro \rightleftharpoons *in silico*



Slika 1: Vežanje sintetskog supstrata Arg-Arg-2-naftilamida u aktivno mjesto a) divljeg tipa (narančasto) i b) N406Q mutanta (ljubičasto) humane dipeptidil-peptidaze III. Atom cinka prikazan je kao kuglica. Mutacija asparagina 406 (obojen prema tipovima atoma i prikazan kao "licorice") u glutamin (obojen prema tipovima atoma i prikazan kao "ball and stick") rezultirala je 70-terostrukim smanjenjem k_{cat} vrijednosti enzima⁶.



Slika 2: Dva načina vezanja pirenskih konjugata guanidiniokarbnil-pirola za dvostruku uzvojniju DNA (poli dA – poli dT). Lijevo: interkaliranje (smještanje u prostor između dvaju susjednih parova baza DNA-a). Desno: vezanje u mali utor DNA. Tijekom 12.5 ns molekulsko dinamičkih simulacija dolazi do relaksacije liganada i dodatne stabilizacije kompleksa intermolekularnim vodikovim vezama.⁷



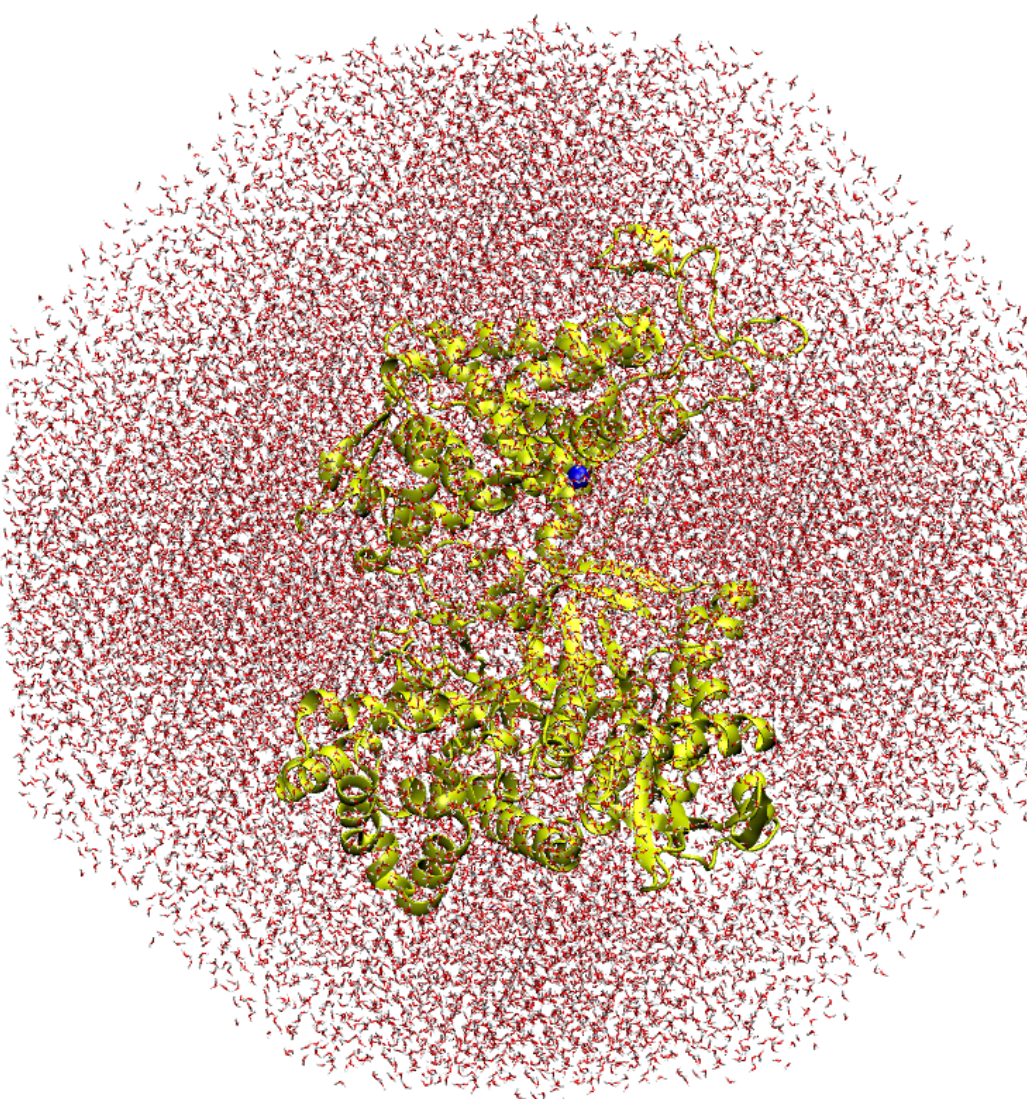
Slika 3: Enzim (6-4) fotolijaza u nekim organizmima odgovoran je za popravak oštećenja molekula DNA nastalih pod utjecajem UV zračenja. Kristalna struktura riješena je 2009., a mehanizam djelovanja enzima još uvijek nije u potpunosti razjašnjen. Uz brojne eksperimente, kao komplementarni pristup u rješavanju problema koristi se i računalno modeliranje, napose molekulska dinamika i QM/MM metodologija.

In silico je izraz koji se sve češće pojavljuje u raznim granama znanosti i tehnologije, a upotrebljava se kada se želi naglasiti da je nešto napravljeno na računalu ili putem računalnih simulacija.

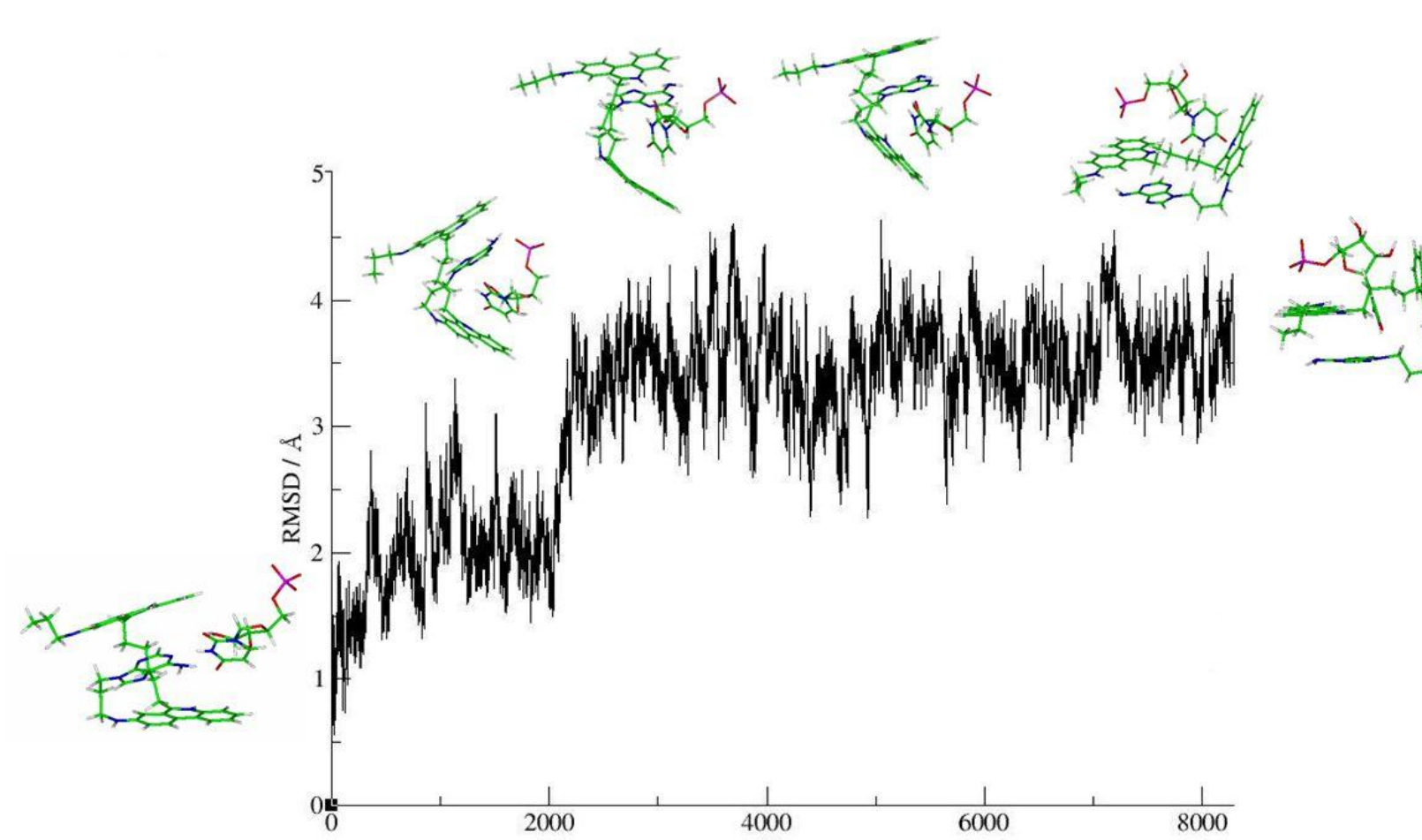
Računalne simulacije u kemiji pridonose razumijevanju kemijskih i bioloških procesa na molekularnoj i sub-molekularnoj razini korištenjem postojećih i razvojem novih računalnih metoda i softvera.

Iako je do prije par desetaka godina ograničavajući faktor u računalnim simulacijama bio broj atoma, s povećanjem brzine rada i kapaciteta memorije računala, glavni ograničavajući faktor ostaje razina teorije s kojom se opisuje sustav.

Modeliranjem BIOMAKROMOLEKULA (kao što su to proteini ili nukleinske kiseline) metodama klasične fizike (npr. molekularna dinamika) omogućeno nam je razumijevanje njihovih statičkih (npr. konformacija u energijskom minimumu) i dinamičkih svojstva te njihovog ponašanje u vodenom mediju (ili nekom drugom otapalu). Za razumijevanje kemijskih reakcija u obzir treba uzeti i elektronsku strukturu molekula korištenjem kvantne mehanike.



Slika 1: Humana dipeptidil-peptidaza III (žuto) otopljena u "kutiji" oblika krnjeg oktaedra ispunjenoj molekulama vode⁵.



Slika 2: Analiza promjene konformacije kompleksa konjugata bisfenantridina s komplementarnim nukleotidom UMP (uridin monofosfat) tijekom 8.5 ns MD simulacija.⁴

Zahvaljujemo našim mentorima i suradnicima što su nam pružili svoje znanje, vrijeme i strpljenje da u okviru njihovih projekata steknemo saznanja iznesena na ovom posteru. Abecednim redom: **dr. sc. Marija Abramić** (Zavod za organsku kemiju u biokemiju, Laboratorij za celularnu biokemiju, IRB), **dr. sc. Agnieszka Bzowska** (Institut za eksperimentalnu fiziku, Sveučilište u Varšavi), **dr. sc. Marija Luić** (Zavod za fizičku kemiju, Laboratorij za kemijsku i biološku kristalografiju, IRB), **dr. sc. David M. Smith** (Zavod za organsku kemiju i biokemiju, Grupa za kvantnu organsku kemiju, IRB), **dr. sc. Sanja Tomić** (Zavod za fizičku kemiju, Laboratorij za kemijsku i biološku kristalografiju, IRB), **dr. sc. Vladislav Tomišić** (Zavod za fizikalnu kemiju, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu).

REFERENCE:

1. Mikleušević, G., Štefanić, Z., Narczyk, M., Wielgus-Kutrowska, B., Bzowska, A., Luić, M. Validation of the catalytic mechanism of *Escherichia coli* purine nucleoside phosphorylase by structural and kinetic studies *Biochimie* (2011) accepted for publication
2. Modrak-Wojcik, A., Kirilenko, A., Shugar, D., Kierdaszuk, B. Role of ionisation of the phosphate cosubstrate on phosphorylation by purine nucleoside phosphorylase (PNP) of bacterial (*E. coli*) and mammalian (human) origin *Eur. Biophys. J.* (2008) 37; 153-164.
3. Mocibob, M., Ivić, N., Bilokapic, S., Maier, T., Lio, M., Ban, N., Weygand-Durasevic, I.: Homologs of aminoacyl-tRNA synthetases acylate carrier proteins and provide a link between ribosomal and nonribosomal peptide synthesis *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 107 (2010), 33; 14585-14590.
4. Tumor, Lidija-Marija; Grabar, Marina; Tomić, Sanja; Plantanida, Ivo, The interactions of bis-phenanthridinium – nucleobase conjugates with nucleotides: adenine conjugate recognizes UMP in aqueous medium *Tetrahedron*. 66 (2010), 13; 2501-2513
5. Tomić, Antonija; Abramić, Marija; Špoljarić, Jasminka; Agić, Dejan; Smith, David M.; Tomić, Sanja, Human Dipeptidyl peptidase III: Insight into Ligand Binding from a Combined Experimental and Computational Approach *Journal of molecular recognition* (2010)
6. Špoljarić, Jasminka; Tomić, Antonija; Vukelić, Bojana; Salopek-Sondi, Bojana; Agić, Dejan; Tomić, Sanja; Abramić, Marija, Human dipeptidyl peptidase III: site-directed mutagenesis proves the importance of Asn406 for ligand binding and hydrolysis *Croatia Chemica Acta*, submitted for publication
7. Groger, Kathrin; Baretić, Domagoj; Plantanida, Ivo; Marjanović, Marko; Kralj, Marijeta; Grabar, Marina; Tomić, Sanja; Schmuck, Carsten, Guanidinocarbonyl-pyrrole-aryl conjugates as nucleic acid sensors: switch of binding mode and spectroscopic responses by introducing additional binding sites into the linker *Organic & biomolecular chemistry*. 9 (2011) ; 198-209